



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

97 EP 0 784 674 B 1

10 DE 695 28 070 T 2

51 Int. Cl.7:  
C 12 N 9/20  
C 12 N 1/14

- 21 Deutsches Aktenzeichen: 695 28 070.8
- 68 PCT-Aktenzeichen: PCT/DK95/00425
- 96 Europäisches Aktenzeichen: 95 934 621.4
- 97 PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 96/013579
- 88 PCT-Anmeldetag: 26. 10. 1995
- 87 Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: 9. 5. 1996
- 97 Erstveröffentlichung durch das EPA: 23. 7. 1997
- 97 Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: 4. 9. 2002
- 87 Veröffentlichungstag im Patentblatt: 12. 6. 2003

DE 695 28 070 T 2

30 Unionspriorität:  
123594 26. 10. 1994 DK

73 Patentinhaber:  
Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

74 Vertreter:  
Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg,  
Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, 81679  
München

84 Benannte Vertragsstaaten:  
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL,  
PT, SE

72 Erfinder:  
OXENBOLL, Karen-M., 2880 Bagsvaerd, DK;  
BORCH, Kim, 2880 Bagsvaerd, DK; PATKAR,  
Shamkant Anant, 2880 Bagsvaerd, DK

54 NEUE LIPOLYTISCHE ENZYME

BEST AVAILABLE COPY

DE 695 28 070 T 2

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

EP 0 784 674 (95 934 621.4)  
Novozymes A/S

20. November 2002  
N37392DE BÖ/smi

### Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft neue lipolytische Enzyme. Genauer stellt die  
5 Erfindung neue lipolytische Enzyme bereit, die von *Fusarium culmorum* abstam-  
men.

### Allgemeiner Stand der Technik

10 Lipolytische Enzyme finden zahlreiche industrielle Anwendungen. Alkalische  
Lipasen sind von besonderem Interesse für die Verwendung in Detergens-  
Zusammensetzungen.

Alkalische Lipasen mikrobieller Herkunft wurden beschrieben einschließlich Li-  
15 pasen, die von *Fusarium* erhalten wurden. Jedoch wurden bislang niemals Lipasen  
offenbart, die von *Fusarium culmorum* erhalten wurden.

### Zusammenfassung der Erfindung

20 Ein Gegenstand der Erfindung ist die Bereitstellung neuer alkalischer lipolytischer  
Enzyme (EC 3.1.1.3).

Demgemäß stellt die Erfindung in ihrem ersten Aspekt ein lipolytisches Enzym  
bereit, das von *Fusarium culmorum* abstammt.

25

Das Enzym hat ein pH-Optimum im Bereich von ungefähr 7 bis ungefähr pH 9,  
genauer um pH 8, wenn dieser bei 30°C mit Tributyrin als Substrat bestimmt  
wird.

Das Enzym hat die nachfolgende N-terminale Aminosäuresequenz (vgl. SEQ ID NO:1):

Ala-Val-Ser-Val-Ser-Thr-Thr-Asp-Phe-Gly-Asn-Phe-Lys-Phe-Tyr-Ile-Gln-His-  
5 Gly-Ala-Ala-Ala-Tyr-Xaa-Asn-

In ihrem zweiten Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zur Zubereitung eines lipolytischen Enzyms bereit, dieses Verfahren umfasst die Kultivierung eines Lipase-produzierenden Stammes von *Fusarium culmorum* in einem geeigneten  
10 Nährmedium, enthaltend Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und andere anorganisch Salze, gefolgt von der Gewinnung des lipolytischen Enzyms.

In ihrem dritten Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zur Zubereitung des lipolytischen Enzyms bereit, dieses Verfahren umfasst die Isolierung eines DNA-  
15 Fragments kodierend für das lipolytische Enzym; Kombinieren des DNA-Fragments mit einem geeigneten Expressionssignal in einem geeigneten Plasmidvektor; Einführen des Plasmidvektors in einen geeigneten Wirt entweder als ein sich autonom replizierendes Plasmid oder integriert in das Chromosom; Kultivieren des Wirtsorganismus unter Bedingungen, die zur Expression des lipolytischen  
20 Enzyms führen; und Gewinnen des Enzyms aus dem Kulturmedium.

In weiteren Aspekten stellt die Erfindung Detergens-Zusammensetzungen ebenso wie Detergens-Additive bereit, die das erfindungsgemäße lipolytische Enzym umfassen.

25

Schließlich stellt die Erfindung eine biologisch reine Kultur des Stammes *Fusarium culmorum* CBS 513.94 bereit.

### Genaue Offenbarung der Erfindung

#### Die Mikroorganismen

5 Die Erfindung stellt lipolytische Enzyme bereit, die von einem Stamm des Pilzes *Fusarium culmorum* abstammen. *Fusarium culmorum* ist eine bekannte Spezies und Stämme von *Fusarium culmorum* wurden hinterlegt und sind öffentlich erhältlich von Hinterlegungsstellen, z.B. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Deutschland und American Type Culture  
10 Collection (ATCC), USA.

In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die Erfindung ein lipolytisches Enzym bereit, das abstammt von dem Stamm *Fusarium culmorum* DSM 1094, *Fusarium culmorum* DSM *Fusarium culmorum* 62184, *Fusarium culmorum* DSM  
15 62188, *Fusarium culmorum* DSM 62191, *Fusarium culmorum* DSM 62223, *Fusarium culmorum* ATCC 12656, *Fusarium culmorum* ATCC 15620, *Fusarium culmorum* ATCC 16430, *Fusarium culmorum* ATCC 16551, *Fusarium culmorum* ATCC 26556, *Fusarium culmorum* ATCC 34910, *Fusarium culmorum* ATCC 34913, *Fusarium culmorum* ATCC 36017, *Fusarium culmorum* ATCC 36879,  
20 *Fusarium culmorum* ATCC 36881, *Fusarium culmorum* ATCC 36886, *Fusarium culmorum* ATCC 44417, *Fusarium culmorum* ATCC 46040, *Fusarium culmorum* ATCC 56088, *Fusarium culmorum* ATCC 56089, *Fusarium culmorum* ATCC 60275, *Fusarium culmorum* ATCC 60362, *Fusarium culmorum* ATCC 62214, *Fusarium culmorum* ATCC 62215, *Fusarium culmorum* ATCC 64075 oder eine  
25 Mutante oder eine Variante hiervon.

In ihrer am meisten bevorzugten Ausführungsform stellt die Erfindung ein lipolytisches Enzym bereit, welches abstammt von dem Stamm *Fusarium culmorum*

CBS 513.94 oder einer Mutante oder einer Variante hiervon. Dieser Stamm wurde gemäß des Budapester Vertrags über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren beim Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Niederlande, am 25. Oktober 1994 hinterlegt.

In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung eine biologisch reine Kultur des Stammes *Fusarium culmorum* CBS 513.94 bereit.

#### 10 Physikalisch-chemische Eigenschaften

In bevorzugten Ausführungsformen können die lipolytischen Enzyme der Erfindung dadurch charakterisiert werden, dass sie eine oder mehrere der folgenden physikalisch-chemischen Eigenschaften ausweisen.

15 Das Enzym hat ein Molekulargewicht von 28,4 kDa, bestimmt durch Massenspektrometrie.

#### Zubereitung des lipolytischen Enzyms

Das erfindungsgemäße lipolytische Enzym kann durch Kultivierung eines Stammes von *Fusarium culmorum* in einem geeigneten Nährmedium enthaltend Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und anorganische Salze, gefolgt von der Gewinnung der Lipase hergestellt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Lipase-herstellende Stamm der Stamm *Fusarium culmorum* CBS 513.94 oder eine Mutante oder eine Variante hiervon.

25

Das lipolytische Enzym kann ebenfalls erhalten werden durch rekombinante DNA-Technologie, durch Verfahren, die *per se* im Stand der Technik bekannt

sind, z.B. Isolierung eines DNA-Fragments kodierend für die Lipase, Kombinieren des DNA-Fragments mit geeignetem/n Expressionssignal(en) in einem geeigneten Vektor, Einführen des Vektors oder Teilen hiervon in einen geeigneten Wirt, entweder als ein sich autonom replizierendes Plasmid oder integriert in das Chromosom, Kultivieren des Wirtsorganismus unter Bedingungen, die zur Expression der Lipase führen und Gewinnen der Lipase aus dem Kulturmedium.

In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ist der Wirtsorganismus bakterieller Herkunft, bevorzugt ein *Escherichia coli* Stamm oder ein *Bacillus* Stamm oder ein *Streptomyces* Stamm oder fungaler Herkunft, bevorzugt ein *Aspergillus* Stamm, ein *Neurospora* Stamm, ein *Fusarium* Stamm oder ein *Trichoderma* Stamm oder eine Hefezelle, bevorzugt ein *Saccharomyces* Stamm oder ein *Kluyveromyces* Stamm oder ein *Hansenula* Stamm oder ein *Pichia* Stamm.

Nach der Kultivierung kann das lipolytische Enzym durch konventionelle Verfahren, wie hydrophobe Chromatographie, Ionenaustauschchromatographie oder Kombinationen hiervon von der Brühekultur zurückgewonnen und gereinigt werden.

#### 20 Lipolytische Aktivität

Die lipolytische Aktivität kann durch die Verwendung von Tributyrin als Substrat bestimmt werden. Dieses Verfahren basiert auf der Hydrolyse von Tributyrin durch das Enzym und der alkalische Verbrauch wird als eine Funktion der Zeit registriert.

25

Eine Lipaseeinheit (Lipase Unit, LU) ist definiert als die Menge an Enzym, welche unter Standardbedingungen (d.h., bei 30,0°C; pH 7,0; und Tributyrin als Sub-

strat), 1  $\mu$ mol titrierbare Buttersäure pro Minute freisetzt. Als Emulgator wird Gummiarabikum verwendet.

Ein Ordner AF 95/5, der diese analytische Methode detaillierter beschreibt, ist auf  
5 Nachfrage erhältlich von Novo Nordisk A/S, Dänemark, dieser Ordner ist hiermit unter Bezugnahme einbezogen.

#### Detergens-Zusammensetzungen

Das erfindungsgemäße lipolytische Enzym kann typischerweise eine Komponente  
10 einer Detergens-Zusammensetzung sein. Als solches kann es in der Detergens-Zusammensetzung in Form eines nicht-staubenden Granulats, einer stabilisierten Flüssigkeit oder eines geschützten Enzymes enthalten sein. Nicht-staubende Granulate können, beispielsweise wie in US 4,106,991 und 4,661,452 (beide von Novo Industri A/S) offenbart, hergestellt werden und können wahlweise durch im  
15 Stand der Technik bekannter Methoden überzogen werden. Beispiele von wachsartigen Überzugmaterialien sind Poyl(ethylenoxid)-Produkte (Poylethylenglykol, PEG) mit mittleren Molekulargewichten von 1000 bis 20.000; ethoxylierte Nonylphenole, die 16 bis 50 Ethylenoxid-Einheiten haben; ethoxylierte Fettalkohole, in welchen der Alkohol von 12 bis 20 Kohlenstoffatome enthält, und in welchen  
20 15 bis 80 Ethylenoxid-Einheiten vorhanden sind; Fettalkohole; Fettsäuren; und Mono-, Di- und Triglyceride von Fettsäuren. Beispiele von filmbildenden Überzugmaterialien, welche durch Fließbett-Techniken zur Anwendung geeignet sind, sind in dem Patent GB 1483591 gegeben. Flüssige Enzymzubereitungen können zum Beispiel durch Hinzufügen eines Polyols, wie Propylenglykol, eines Zuckers  
25 oder Zuckeralkohols, Milchsäure oder Borsäure, nach etablierten Verfahren stabilisiert werden. Andere Enzymstabilisierer sind im Stand der Technik gut bekannt. Geschützte Enzyme können nach dem in der EP 238,216 offenbarten Verfahren zubereitet werden.

Die erfindungsgemäße Detergens-Zusammensetzung kann in jeder geeigneten Form vorliegen, z.B. als Pulver, Körnchen, Paste oder Flüssigkeit. Ein flüssiges Detergens kann wässrig sein, typischerweise bis zu 70 % Wasser und 0-30 % organisches Lösungsmittel enthaltend, oder nicht-wässrig sein.

5

Die Detergens-Zusammensetzung umfasst ein oder mehrere Tenside, von denen jedes anionisch, nicht-ionisch, kationisch oder zwitterionisch sein kann. Das Detergens enthält üblicherweise 0-50 % eines anionischen Tensides, wie lineares Alkylbenzolsulfonat (LAS), alpha-Olefinsulfonat (AOS), Alkylsulfat (Fettalkoholsulfat) (AS), Alkoholethoxysulfat (AEOS oder AES), sekundäre Alkansulfonate (SAS), alpha-Sulfofettsäuremethylester, Alkyl- oder Alkenylsuccinsäure oder Seife. Es kann ebenfalls 0-40 % nicht-ionische Tenside enthalten, wie Alkoholethoxylat (AEO oder AE), carboxylierte Alkoholethoxylate, Nonylphenolethoxylat, Alkylpolyglykosid, Alkyldimethylaminoxid, ethoxyliertes Fettsäuremonoethanolamid, Fettsäuremonoethanolamid oder Polyhydroxyalkylfettsäureamid (z.B. wie in WO 92/06154 beschrieben).

Die Detergens-Zusammensetzung kann zusätzlich ein oder mehrere andere Enzyme enthalten, die herkömmlich in Detergens-Zusammensetzungen verwendet werden, wie eine Amylase, eine Kutinase, eine Protease, eine Cellulase, eine Peroxidase und/oder eine Oxidase.

Das Detergens kann 1-65 % eines Detergens-Bildners oder komplexierenden Agens, wie Zeolith, Diphosphat, Triphosphat, Phosphonat, Citrat, Nitrietriessigsäure (NTA), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Diethylentriaminpentaessigsäure (DTMPA), Alkyl- oder Alkenylsuccinsäure, lösliche Silicate oder geschichtete Silicate (z.B. SKS-6 von Hoechst). Das Detergens kann ebenso ungebildet, d.h., im wesentlichen frei von Detergens-Bildnern, sein.

Das Detergens kann ein oder mehrere Polymere umfassen. Beispiele sind Carboxymethylcellulose (CMC), Poly(vinylpyrrolidon) (PVP), Polyethylenglykol (PEG), Poly(vinylalkohol) (PVA), Polycarboxylate, wie Polyacrylate, Malein-/Acrylsäurecopolymere und Laurylmethacrylat-/Acrylsäurecopolymere.

5

Das Detergens kann ein Bleichsystem enthalten, welches eine  $H_2O_2$ -Quelle, wie Perborat oder Percarbonat, umfasst, welche mit einem Persäure-formenden Bleichaktivator, wie Tetraacetylenhydramid (TAED) oder Nonanoyloxybenzolsulfonat (NOBS) kombiniert sein kann. Alternativ kann das Bleichsystem Peroxysäuren von, z.B. dem Amid-, Imid- oder Sulfontyp, umfassen.

10

Die Enzyme der erfindungsgemäßen Detergens-Zusammensetzung können unter Verwendung herkömmlicher stabilisierender Agenzien, z.B. eines Polyols, wie Propylenglykol oder Glycerol, eines Zuckers oder Zuckeralkohols, Milchsäure, Borsäure oder eines Borsäure-Derivats, wie z.B. ein aromatischer Boratester stabilisiert werden und die Zusammensetzung kann, wie z.B. in WO 92/19709 und WO 92/19708 beschrieben, formuliert werden.

15

Das Detergens kann ebenso andere herkömmliche Detergens-Bestandteile enthalten, wie z.B. Strukturverbesserer, die Lehm enthalten, Seifen-Verstärker, Seifenlaugenunterdrücker, Anti-Rostmittel, Boden-suspendierende Agenzien, Anti-Boden-rückverschmutzende (anti-soil-redeposition) Agenzien, Farben, Bakterizide, optische Aufheller oder Duftstoff.

20

Der pH (gemessen in wässriger Lösung bei verwendeter Konzentration) ist gewöhnlich neutral oder alkalisch, z.B. im Bereich von 7-11.

25

Besondere Formen von Detergens-Zusammensetzungen unter dem Schutzbereich der Erfindung enthalten:

- 1) Eine Detergens-Zusammensetzung, formuliert als ein Granulat, mit einer Rohdichte von mindestens 600 g/l umfassend

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	7-12 %
Alkoholethoxysulfonat (z.B. C <sub>12-18</sub> -Alkohol, 1-2 EO) oder Alkylsulfat (z.B. C <sub>16-18</sub> )	1-4 %
Alkoholethoxylat (z.B. C <sub>14-15</sub> -Alkohol, 7 EO)	5-9 %
Natriumcarbonat (wie Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	14-20 %
Lösliches Silicat (wie Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	2-6 %
Zeolith (wie NaAlSiO <sub>4</sub> )	15-22 %
Natriumsulfat (wie Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0-6 %
Natriumcitrat/Zitronensäure (wie C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	0-15 %
Natrimperborat (wie NaBO <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O)	11-18 %
TAED	2-6%
Carboxymethylcellulose	0-2 %
Polymere (z.B. Malein-/Acrylsäurecopolymer, PVP, PEG)	0-3 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001-0,1 %
Nebenbestandteile (z.B. Seifenlaugenunterdrücker, Duftstoff, optischer Aufheller, Photobleichmittel)	0-5 %

- 2) Eine Detergens-Zusammensetzung, formuliert als Granulat mit einer Rohdichte von mindestens 600 g/l umfassend

10

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	6-11 %
Alkoholethoxysulfonat (z.B. C <sub>12-18</sub> -Alkohol, 1-2 EO) oder Alkylsulfat (z.B. C <sub>16-18</sub> )	1-3 %

Alkoholethoxylat (z.B. C <sub>14-15</sub> -Alkohol, 7 EO)	5-9 %
Natriumcarbonat (wie Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	15-21 %
Lösliches Silicat (wie Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	1-4 %
Zeolith (wie NaAlSiO <sub>4</sub> )	24-34 %
Natriumsulfat (wie Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4-10 %
Natriumcitrat/Zitronensäure (wie C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	0-15 %
Carboxymethylcellulose	0-2 %
Polymere (z.B. Malein-/Acrylsäurecopolymer, PVP, PEG)	1-6 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001-0,1 %
Nebenbestandteile (z.B. Seifenlaugenunterdrücker, Duftstoff)	0-5 %

3) Eine Detergens-Zusammensetzung, formuliert als Granulat mit einer Rohdichte von mindestens 600 g/l umfassend

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	5-9 %
Alkoholethoxylat (z.B. C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 7 EO)	7-14 %
Seife als Fettsäure (z.B. C <sub>16-22</sub> -Fettsäure)	1-3 %
Natriumcarbonat (wie Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	10-17 %
Lösliches Silicat (wie Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	3-9 %
Zeolith (wie NaAlSiO <sub>4</sub> )	23-33 %
Natriumsulfat (wie Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0-4 %
Natriumperborat (wie NaBO <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O)	8-16 %
TAED	2-8 %
Phosphonat (z.B. EDTMPA)	0-1 %
Carboxymethylcellulose	0-2 %
Polymere (z.B. Malein-/Acrylsäurecopolymer, PVP, PEG)	0-3 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001-0,1 %
Nebenbestandteile (z.B. Seifenlaugenunterdrücker, Duftstoff, optischer Aufheller)	0-5 %

- 4) Eine Detergens-Zusammensetzung, formuliert als Granulat mit einer Rohdichte von mindestens 600 g/l umfassend

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	8-12 %
Alkoholethoxylat (z.B. C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 7 EO)	10-25 %
Natriumcarbonat (wie Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	14-22 %
Lösliches Silicat (wie Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	1-5 %
Zeolith (wie NaAlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub> )	25-35 %
Natriumsulfat (wie Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0-10 %
Carboxymethylcellulose	0-2 %
Polymere (z.B. Malein-/Acrylsäurecopolymer, PVP, PEG)	1-3 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001-0,1 %
Nebenbestandteile (z.B. Seifenlaugenunterdrücker, Duftstoff)	0-5 %

- 5) Eine wässrige flüssige Detergens-Zusammensetzung umfassend

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	15-21 %
Alkoholethoxylat (z.B. C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 7 EO oder C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 5 EO)	12-18 %
Seife als Fettsäure (z.B. Ölsäure)	3-13 %
Alkenylsuccinsäure (C <sub>12-14</sub> )	0-13 %
Aminoethanol	8-18 %
Zitronensäure	2-8 %
Phosphonat	0-3 %
Polymere (z.B. PVP, PEG)	0-3 %
Borat (wie B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	0-2 %
Ethanol	0-3 %
Propylenglykol	8-14 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001-0,1 %

Nebenbestandteile (z.B. Dispergiermittel, Seifenlaugenunterdrücker, Duftstoff, optischer Aufheller)	0-5 %
---	-------

## 6) Eine wässrige strukturierte flüssige Detergens-Zusammensetzung umfassend

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	15-21 %
Alkoholethoxylat (z.B. C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 7 EO oder C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 5 EO)	3-9 %
Seife als Fettsäure (z.B. Ölsäure)	3-10 %
Zeolith (wie NaAlSiO <sub>4</sub> )	14-22 %
Kaliumcitrat	9-18 %
Borat (wie B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	0-2 %
Carboxymethylcellulose	0-2 %
Polymere (z.B. PEG, PVP)	0-3 %
Ankerpolymere, wie z.B. Laurylmethacrylat-/Acrylsäurecopolymer; molares Verhältnis 25:1; MW 3800	0-3 %
Glycerol	0-5 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001- 0,1 %
Nebenbestandteile (z.B. Dispergiermittel, Seifenlaugenunterdrücker, Duftstoff, optischer Aufheller)	0-5 %

## 5 7) Eine Detergens-Zusammensetzung, formuliert als Granulat mit einer Rohdichte von mindestens 600 g/l umfassend

Fettalkoholsulfat	5-10 %
Ethoxyliertes Fettsäuremonoethanolamid	3-9 %
Seife als Fettsäure	0-3 %
Natriumcarbonat (wie Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	5-10 %
Lösliches Silicat (wie Na <sub>2</sub> O <sub>2</sub> SiO <sub>2</sub> )	1-4 %
Zeolith (wie NaAlSiO <sub>4</sub> )	20-40 %

Natriumsulfat (wie $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )	2-8 %
Natriumperborat (wie $\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	12-18 %
TAED	2-7 %
Polymere (z.B. Malein-/Acrylsäurecopolymer, PEG)	1-5 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001-0,1 %
Nebenbestandteile (z.B. optischer Aufheller, Seifenlaugenunterdrücker, Duftstoff)	0-5 %

## 8) Eine Detergens-Zusammensetzung formuliert als Granulat umfassend

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	8-14 %
Ethoxyliertes Fettsäuremonoethanolamid	5-11 %
Seife als Fettsäure	0-3 %
Natriumcarbonat (wie $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	4-10 %
Lösliches Silicat (wie $\text{Na}_2\text{O}, 2\text{SiO}_2$ )	1-4 %
Zeolith (wie $\text{NaAlSiO}_4$ )	30-50 %
Natriumsulfat (wie $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )	3-11 %
Natriumcitrat (wie $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ )	5-12 %
Polymere (z.B. PVP, Malein-/Acrylsäurecopolymer, PEG)	1-5 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001-0,1 %
Nebenbestandteile (z.B. Seifenlaugenunterdrücker, Duftstoff)	0-5 %

## 5 9) Eine Detergens-Zusammensetzung formuliert als Granulat umfassend

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	6-12 %
Nicht-ionisches Tensid	1-4 %
Seife als Fettsäure	2-6 %
Natriumcarbonat (wie $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	14-22 %
Zeolith (wie $\text{NaAlSiO}_4$ )	18-32 %

Natriumsulfat (wie $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )	5-20 %
Natriumcitrat (wie $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ )	3-8 %
Natriumperborat (wie $\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	4-9 %
Bleichaktivator (z.B. NOBS oder TAED)	1-5 %
Carboxymethylcellulose	0-2 %
Polymere (z.B. Polycarboxylat oder PEG)	1-5 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001-0,1 %
Nebenbestandteile (z.B. optischer Aufheller, Duftstoff)	0-5 %

## 10) Eine wässrige flüssige Detergens-Zusammensetzung umfassend

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	15-23 %
Alkoholethoxysulfat (z.B. $\text{C}_{12-15}$ -Alkohol, 2-3 EO)	8-15 %
Alkoholethoxylat (z.B. $\text{C}_{12-15}$ -Alkohol, 7 EO oder $\text{C}_{12-15}$ -Alkohol, 5 EO)	3-9 %
Seife als Fettsäure (z.B. Laurinsäure)	0-3 %
Aminoethanol	1-5 %
Natriumcitrat	5-10 %
Hydrotropikum (z.B. Natriumtoluolsulfonat)	2-6 %
Borat (wie $\text{B}_4\text{O}_7$ )	0-2 %
Carboxymethylcellulose	0-1 %
Ethanol	1-3 %
Propylenglykol	2-5 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001-0,1 %
Nebenbestandteile (z.B. Polymere, Dispergiemittel, Duftstoff, optischer Aufheller)	0-5 %

## 11) Eine wässrige flüssige Detergens-Zusammensetzung umfassend

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	20-32 %
Alkoholethoxylat (z.B. C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 7 EO oder C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 5 EO)	6-12 %
Aminoethanol	2-6 %
Zitronensäure	8-14 %
Borat (wie B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	1-3 %
Polymer (z.B. Malein-/Acrylsäurecopolymer, Ankerpolymer, wie z.B. Laurylmethacrylat-/Acrylsäurecopolymer)	0-3 %
Glycerol	3-8 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001-0,1 %
Nebenbestandteile (z.B. Hydrotropika, Dispergiermittel, Duftstoff, optischer Aufheller)	0-5 %

5 12) Eine Detergens-Zusammensetzung, formuliert als Granulat mit einer Rohdichte von mindestens 600 g/l umfassend

Anionisches Tensid (lineares Alkylbenzolsulfonat, Alkylsulfat, alpha-Olefinsulfonat, alpha-Sulfofettsäuremethylester, Alkansulfonate, Seife)	25-40 %
Nicht-ionisches Tensid (z.B. Alkoholethoxylat)	1-10 %
Natriumcarbonat (wie Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	8-25 %
Lösliche Silicate (wie Na <sub>2</sub> O,2SiO <sub>2</sub> )	5-15 %
Natriumsulfat (wie Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0-5 %
Zeolith (wie NaAlSiO <sub>4</sub> )	15-28 %
Natriumperborat (wie NaBO <sub>3</sub> .4H <sub>2</sub> O)	0-20 %
Bleichaktivator (TAED oder NOBS)	0-5 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001-0,1 %
Nebenbestandteile (z.B. Duftstoff, optischer Aufheller)	0-3 %

13) Detergens-Zusammensetzungen wie in 1) - 12) beschrieben, wobei das gesamte oder Teile des linearen Alkylbenzolsulfonats durch (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkylsulfat ersetzt ist/sind.

- 5 14) Eine Detergens-Zusammensetzung, formuliert als Granulat mit einer Rohdichte von mindestens 600 g/l umfassend

(C <sub>12</sub> -C <sub>18</sub> )-Alkylsulfat	9-15 %
Alkoholethoxylat	3-6 %
Polyhydroxyalkylfettsäureamid	1-5 %
Zeolith (wie NaAlSiO <sub>4</sub> )	10-20 %
geschichtetes Disilicat (z.B. SK56 von Hoechst)	10-20 %
Natriumcarbonat (wie Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	3-12 %
Lösliches Silicat (wie Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	0-6 %
Natriumcitrat	4-8 %
Natriumpercarbonat	13-22 %
TAED	3-8 %
Polymere (z.B. Polycarboxylate und PVP)	0-5 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001-0,1 %
Nebenbestandteile (z.B. optischer Aufheller, Photobleichmittel, Duftstoff, Seifenlaugenunterdrücker)	0-5 %

- 10 15) Eine Detergens-Zusammensetzung, formuliert als Granulat mit einer Rohdichte von mindestens 600 g/l umfassend

(C <sub>12</sub> -C <sub>18</sub> )-Alkylsulfat	4-8 %
Alkoholethoxylat	11-15 %
Seife	1-4 %
Zeolith MAP oder Zeolith A	35-45 %

Natriumcarbonat (wie $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	2-8 %
lösliches Silicat (wie $\text{Na}_2\text{O}$ , $2\text{SiO}_2$ )	0-4 %
Natriumpercarbonat	13-22 %
TAED	1-8 %
Carboxymethylcellulose	0-3 %
Polymere (z.B. Polycarboxylate und PVP)	0-3 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001-0,1 %
Nebenbestandteile (z.B. optischer Aufheller, Phosphonat, Duftstoff)	0-3 %

16) Detergens-Formulierungen wie in 1) bis 15) beschrieben, welche eine stabilisierte oder verkapselte Persäure, enthalten, entweder als eine zusätzliche Komponente oder als ein Substituent für bereits spezifizierte Bleichsysteme.

5

17) Detergens-Zusammensetzungen wie in 1), 3), 7), 9) und 12) beschrieben, worin Perborat durch Percarbonat ersetzt ist.

18) Detergens-Zusammensetzungen wie in 1), 3), 7), 9), 12), 14) und 15) beschrieben, welche zusätzlich einen Mangan-Katalysator enthalten. Der Mangan-Katalysator kann, z.B. eine der Komponente sein, die in "Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching", Natur 369, 1994, pp. 637-639, beschrieben ist.

10

19) Detergens-Zusammensetzungen, formuliert als nicht-wässrige Detergens-Flüssigkeit, umfassend ein flüssiges nicht-ionisches Tensid wie z.B. linearer alkoxylierter primärer Alkohol, ein Builder-System (builder-system) (z.B. Phosphat), Enzym und Alkali. Das Detergens kann ebenso anionische Tenside und/oder ein Bleichsystem umfassen.

20

Das erfindungsgemäße lipolytische Enzym kann in Konzentrationen eingefügt werden, die herkömmlich in Detergenzien verwendet werden. Es ist gegenwärtig beabsichtigt, dass in der erfindungsgemäßen Detergens-Zusammensetzung die Lipase in einer Menge hinzugefügt werden kann, die 0,001 bis 100 mg Lipase pro  
5 Liter Waschlauge entspricht.

### Beispiele

Die Erfindung wird weiterhin unter Bezugnahme zu den folgenden Beispielen  
10 illustriert, welche nicht dazu gedacht sind, den beanspruchten Schutzbereich der Erfindung in irgendeiner Weise zu beschränken.

#### Beispiel 1

##### Kultivierungs-Beispiel

15 Samenkulturen des Stammes *Fusarium culmorum* CBS 513.94 wurden in 500 ml Schüttelflaschen hergestellt, die 100 ml der folgenden Zusammensetzung enthielten:

	Corn steep liquer (getrocknet)	12 g/l
20	Glukose	24 g/l

Zu jeder Falsche werden 0,5 g CaCO<sub>3</sub> und 0,5 ml Öl hinzugegeben. Der pH wird vor der Autoklavierung auf 5,5 eingestellt.

25 Nach 3 Tagen bei 26°C und 250 rpm, wurden 5 ml von jeder der Samenkulturen in Schüttelflaschen inokuliert, die 100 ml des folgenden Mediums enthielten:

	Pepton, Difco 0118	6 g/l
	Pepticase, Sheffield Products	4 g/l
	Hefeextrakt, Difco 0127	3 g/l
5	Fleischextrakt, Difco 0126	1,5 g/l
	Dextrose, Roquette 101-0441	1 g/l
	Olivenöl, Sigma	10 g/l

Der pH wird vor der Autoklavierung auf 7,3 bis 7,4 eingestellt.

10

Die Kultivierung fand 9 Tage bei 26°C und 250 rpm statt. Die Brühen wurden zentrifugiert und der Überstand über eine hydrophobe Matrix (TSK GelButyl ToyoPearl 650 C-Säule, erhältlich von Tosoh Corporation, Japan) aufgereinigt und für weitere Studien verwendet.

15

### Beispiel 2

#### Charakterisierungs-Beispiel

##### pH-Optimum

Der Überstand, erhalten nach Beispiel 1, wurde dem LU-Verfahren zur Bestimmung der Lipaseaktivität, wie oben beschrieben unterworfen und das Verhältnis zwischen pH und Lipaseaktivität des erfindungsgemäßen lipolytischen Enzyms wurde bei 30°C in dem Bereich von pH 6 bis pH 10 bestimmt.

25

Die Ergebnisse dieser Charakterisierung sind in Figur 1 dargestellt. Das lipolytische Enzym hat seinen pH-Optimum in dem Bereich von ca. pH 7 bis ca. pH 9, genauer um pH 8.

### Molekulargewichts-Bestimmung

Es wurde eine Massenspektrometrie vorgenommen unter Verwendung der Matrix unterstützten Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeit (laser desorption ionisation time-of flight) (MALDI-TOF) Massenspektrometrie in einem VG analytischen ToFSpec. Für die Massenspektrometrie wurden 2 µl der nach Beispiel 1 erhaltenen Probe mit 2 µl gesättigter Matrix-Lösung ( $\alpha$ -cyano-4-Hydroxyphenylpropensäure in 0,1 % TFA:Acetonitril (70:30)) gemischt und 2 µl der Mischung wurden auf die Zielplatte gepunktet. Vor dem Einführen in das Massenspektrometer wurde das Lösungsmittel durch Evaporation entfernt. Die Probe wurde desorbiert und ionisiert durch 4 ns Laserpulsen (337 nm) bei Grenzwertlaserkraft und in die Feld-freie Flugtube mit einer Beschleunigungsspannung von 25 kV beschleunigt. Ionen wurden durch eine Mikrokanalplatte bei 1850 V detektiert. Die Spektren wurden außerhalb mit Proteinen von bekannter Masse berechnet.

Eine Masse von 28,4 kDa wurde bestimmt.

### N-terminale Aminosäuresequenz

Unter Verwendung von Standardmethoden zur Erhaltung und Sequenzierung von Peptiden [Findlay & Geisow (Eds.) (1989), Protein sequencing - a practical approach; IRL Press] wurden die folgenden 25 N-terminalen Aminosäurereste des lipolytischen Enzyms identifiziert, wie gezeigt in SEQ ID NO:1 (wobei Xaa einen unbekanntem Aminosäurerest kennzeichnet):

Ala-Val-Ser-Val-Ser-Thr-Thr-Asp-Phe-Gly-Asn-Phe-Lys-Phe-Tyr-Ile-Gln-His-Gly-Ala-Ala-Ala-Tyr-Xaa-Asn-

**Beispiel 3**

**Lipolytische Aktivität**

Unter Verwendung einer Einzelschichtenausrüstung (monolayer equipment) (KSV-5000, KSV Instruments, Finnland) wurde gezeigt, dass das lipolytische Enzym aus *Fusarium culmorum* eine beträchtlich ansteigende Aktivität gegenüber Dicaprin in Gegenwart von langkettigen Alkoholethoxylaten hat.

Eine gemischte Einzelschicht in einer gut definierten Gesamt-Zusammensetzung (overall composition), hergestellt aus einem Diglyceridsubstrat und einem Einzelkomponenten Alkoholethoxylat (AEO: Heptaethylenglycolmonooctadecylether) wurde auf die flüssige Unterphase gesprüht (10 mM Glycin, pH 10,0, 0,1 mM EDTA, 25°C). Der Oberflächendruck wird auf den gewünschten Wert eingestellt und eine gut-definierte Menge Enzym (10 LU; Lipaseeinheiten wie oben definiert) wird in die Unterphase injiziert. Die lipolytische Wirkung wird durch die Geschwindigkeit einer mobilen Barriere offenbart, welche die Einzelschicht komprimiert um einen konstanten Oberflächendruck zu erhalten, wie unlösliche Substratmoleküle in Wasser löslichere Reaktionsprodukte hydrolysiert werden. Bei Verwendung dieses Assays werden die lipolytischen Enzyme durch einen Parameter  $\beta$  unterschieden, welcher die Endflächenfraktion des Substrates (Dicaprin) anzeigt, welches unhydrolysiert durch das Enzym als lipolytischen Aktivitätsstopps zurückbleibt.

Auf diesem Weg wurde die erfindungsgemäße Lipase verglichen mit einer *Aspergillus*-Lipase, die herkömmlich in Detergenzien verwendet wird (Lipolase™, erhältlich von Novo Nordisk A/S, Dänemark). Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Verbesserte Toleranz des lipolytischen Enzyms von *Fusarium culmorum* verglichen mit der Lipolase™.

	$\beta$ (30 mN/m)*
Lipolase™	57 %
<i>Fusarium culmorum</i> Lipase	25 %

\*Angewandter Oberflächendruck.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das lipolytische Enzym, erhalten aus *Fusarium culmorum*, im Vergleich zur Lipolase™ beachtlich effizienter ist, wenn Alkoholethoxylate in der Substratphase anwesend sind.

#### 15 Beispiel 4

##### Substrataffinität

Es ist ein Verfahren entwickelt worden, das auf einen einfachen Vergleich der Fähigkeit lipolytischer Enzyme abzielt, sich in/auf einer Substratphase (Olivenöl) bei alkalischem pH (pH 9,0) in der Gegenwart des nicht-ionischen Tensides Dobanol 25-7 (2500 ppm) in der wässrigen Phase anzureichern.

##### Verfahren

1. Zwei identische Pufferlösungen (5 ml) werden in 20 ml siegelbaren Röhren zubereitet ("Probe" (s) und "Referenz" (r)).
- 25 2. Das Enzym wird hinzugefügt zu der "Probe" und der "Referenz" und die Lipasekonzentration wird bestimmt (X LU/ml).

3. Olivenöl wird auf die "Probe" hinzugefügt und beide Lipaselösungen werden stark geschüttelt. Inkubation bei 4°C über Nacht.
4. Die verbleibende Lipase-Konzentration in den wässrigen Phasen wird nach der Inkubation bestimmt ( $Y_i$  LU/ml;  $i=r,s$ ).

5

#### Zusammenfassung der Inkubationsbedingungen

Puffer	100 mM Glycin (5 ml).
pH	9,0.
Substrat	Olivenöl (5 ml).
10 Temperatur	4°C.
Lipaseaktivität	5-10 LU/ml.
Inkubation	über Nacht (24-26 Stunden).

#### Evaluierung der Daten

- 15 Das Ergebnis wird errechnet durch den Vergleich des Aktivitätsverlusts nach der Inkubation in der wässrigen Phase in Kontakt mit Olivenöl mit dem Aktivitätsverlust in wässriger Phase in Abwesenheit von Olivenöl:

$$\alpha = Y_s / Y_r \text{ (siehe oben)}$$

20

Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle 2 aufgeführt.

25

**Tabelle 2****Substrataffinität**

	Lipolytisches Enzym	$\alpha$ (%)
5	Lipolase™	99 %
	<i>Fusarium culmorum</i> Lipase	99 %

201102

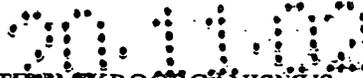
- 1 -

EP 0 784 674 (95 934 621.4)  
Novozymes A/S

20. November 2002  
N37392DE BÖ/smi

SEQUENZLISTE

- (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:1:
- 5 (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN
- (A) LÄNGE: 25 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (C) STRANG: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- 10 (ii) MOLEKÜL-TYP: Peptid
- (v) FRAGMENT-TYP: N-terminal
- (vi) URSPRUNGSQUELLE:
- (A) ORGANISMUS: Fusarium culmorum
  - (B) STAMM: CBS 513.94
- 15 (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
  - (B) LAGE: 101..1433
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:
- 20 Ala Val Ser Val Ser Thr Thr Asp Phe Gly Asn Phe Lys Phe Tyr Ile  
1 5 10 15
- Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr Xaa Asn  
20 25



ANGABEN ZU EINEM HINTERLEGTEM MIKROORGANISMUS

(Regel 13<sup>bis</sup> PCT)

A. Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus, der in der Beschreibung genannt ist auf Seite <u>3</u> , Zeilen <u>9-14</u>	
B. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG <span style="float: right;">Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt gekennzeichnet <input type="checkbox"/></span>	
Name der Hinterlegungsstelle  <b>CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES</b>	
Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)  <b>Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Barn, Niederlande</b>	
Datum der Hinterlegung  <b>25. Oktober 1994</b>	Eingangnummer  <b>CBS 513.94</b>
C. WEITERE ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen) <span style="float: right;">Diese Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt <input type="checkbox"/></span>	
<p>Im Hinblick auf solche Benennungen, für die ein europäisches und/oder australisches Patent begehrt wird, ist eine Probe des hinterlegten Mikroorganismus während der Anhängigkeit der Patentanmeldung nur an einen unabhängigen Experten bereitzustellen, der von der Person, welche die Probe anfordert, zu benennen ist (Regel 28(4) EPÜ / Verordnung 3.25 der Australischen Gesetzlichen Regeln 1991 Nr. 71).</p>	
D. BESTIMMUNGSSTAATEN; FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN (falls die Angaben nicht für alle Bestimmungsstaaten gelten)	
E. NACHREICHUNG VON ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen)	
Die nachstehenden Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht (bitte Art der Angaben nennen z.B. "Eingangnummer der Hinterlegung")	

Nur zur Verwendung im Anmeldeamt	Nur zur Verwendung im Internationalen Büro
<input type="checkbox"/> Dieses Blatt ist eingegangen mit der internationalen Anmeldung	<input type="checkbox"/> Dieses Blatt ist beim Internationale Büro eingegangen am:
Bevollmächtigter Bediensteter  <b>Anne-Grethe Henriksson Head Clerk</b>	Bevollmächtigter Bediensteter

Form PCT/RO/134 (Juli 1992)

EP 0 784 674 (95 934 621.4)  
Novozymes A/S

20. November 2002  
N37392DE BÖ/smi

### Patentansprüche

1. Lipolytisches Enzym, welches:
  - 5 a) von einem *Fusarium culmorum* Stamm abstammt,
  - b) ein pH-Optimum in dem Bereich von ungefähr 7 bis ungefähr pH 9 hat, wenn dieser bei 30°C mit Tributyrin als Substrat bestimmt wird, und
  - c) die folgende N-terminale Aminosäuresequenz hat:  
Ala-Val-Ser-Val-Ser-Thr-Thr-Asp-Phe-Gly-Asn-Phe-Lys-Phe-Tyr-Ile-Gln-  
10 His-Gly-Ala-Ala-Ala-Tyr-Xaa-Asn-
2. Lipolytisches Enzym nach Anspruch 1, welches von dem Stamm *Fusarium culmorum* CBS 513.94 abstammt.
- 15 3. Lipolytisches Enzym nach Anspruch 1 oder 2, welches ein Molekulargewicht von 28,4 kDa durch Massenspektrometrie hat.
4. Verfahren zur Zubereitung eines lipolytischen Enzyms nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dieses Verfahren umfasst die Kultivierung eines Lipase-herstellenden Stammes von *Fusarium culmorum* in einem geeigneten Nähr-  
20 medium, welches Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und andere anorganische Salze enthält, gefolgt von der Gewinnung des lipolytischen Enzyms.
5. Verfahren nach Anspruch 4, in welchem der Lipase-herstellende Stamm der  
25 Stamm *Fusarium culmorum* CBS 513.94 ist.
6. Verfahren zur Zubereitung eines lipolytischen Enzyms nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dieses Verfahren umfasst die Isolierung eines DNA-

5 Fragments kodierend für das lipolytische Enzym; Kombinieren des DNA-Fragments mit einem geeigneten Expressionssignals in einem geeigneten Plasmidvektor; Einführen des Plasmidvektors in einen geeigneten Wirt entweder als ein sich autonom replizierendes Plasmid oder integriert in das Chromosom; Kultivieren des Wirtsorganismus unter Bedingungen, die zur Expression des lipolytischen Enzyms führen; und Gewinnung des Enzyms aus dem Kulturmedium.

10 7. Verfahren nach Anspruch 6, in welchem der Wirtsorganismus bakterieller Herkunft ist, bevorzugt ein *Escherichia coli* Stamm oder ein *Bacillus* Stamm oder ein *Streptomyces* Stamm oder fungaler Herkunft, bevorzugt ein *Aspergillus* Stamm, ein *Neurospora* Stamm, ein *Fusarium* Stamm oder ein *Trichoderma* Stamm oder eine Hefezelle, bevorzugt ein *Saccharomyces* Stamm oder ein *Kluyveromyces* Stamm oder ein *Hansenula* Stamm oder ein *Pichia* Stamm.

15

8. Detergens-Zusammensetzung umfassend das lipolytische Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 3.

20

9. Detergens-Zusammensetzung nach Anspruch 8, welche ferner ein oder mehrere andere Enzyme umfasst, insbesondere Proteasen, Amylasen, Cellulasen, Oxidasen und/oder Peroxidasen.

25

10. Detergens-Zusatz umfassend das lipolytische Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bereitgestellt in Form eines Granulats, vorzugsweise eines nicht-staubenden Granulats, einer Flüssigkeit, insbesondere eine stabilisierte Flüssigkeit, eines Schlamms oder eines geschützten Enzyms.

11. Biologisch reine Kultur des Stammes *Fusarium culmorum* CBS 513.94.

695 28.070.8

20110

1/1

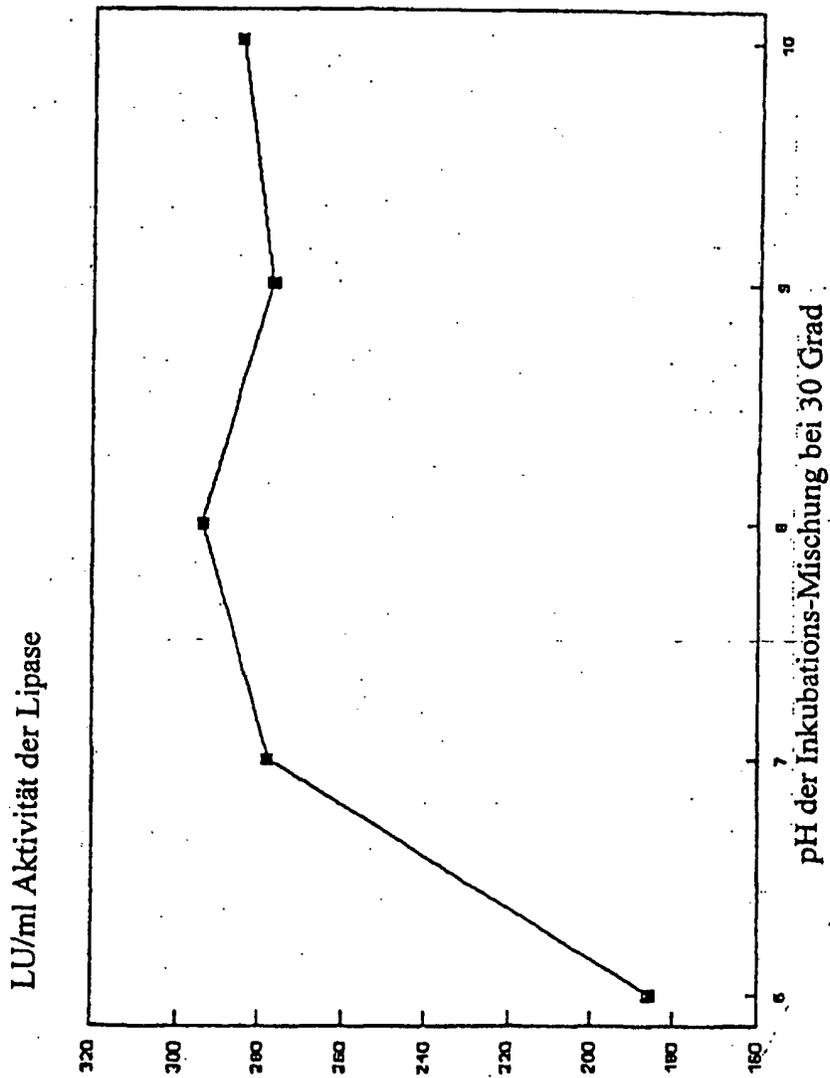


FIG. 1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**